

## 各種 RNA ファージに用いられる精製法の検討とその応用

西原 徹

RNA ファージ粒子の大量培養, 精製を行うための方法を検討した。ポリエチレングリコール-デキストラン硫酸を用いる方法が有効であることがわかった。さらにこの方法を4種のRNA ファージの精製に適用して精製した結果を示した。(昭和63年12月27日採用)

### Investigation on Purification Method for Applying to Various RNA Phages and Its Application

Tohru Nishihara

I have investigated the methods to isolate and purify RNA phages in large quantity. It is found that polyethylene glycol and dextran sulfate precipitation method is most effective to precipitate the phages. By using this method, I have purified four different RNA phages and presented the results. (Accepted on December 27, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15 (1): 129-132, 1989

**Key Words** ① RNA phages ② Purification

#### はじめに

RNA ファージ粒子の精製法は今までにいくつかの方法が用いられてきた。菌体の残渣を除いたファージを含んだ溶菌液を出発材料に用いて, それを超遠心分離による方法,<sup>1)</sup> 硫酸アンモニウムによる塩析による方法,<sup>2)</sup> ポリエチレングリコールやデキストラン硫酸を用いる方法である。<sup>3),4)</sup> いずれの方法も最後の段階に塩化セシウムによる密度勾配遠心を用いて精製を行っている。ここでは多量のファージの精製に用いることが可能なポリエチレングリコールとデキストラン硫酸を用いる方法を検討し, 4種のRNA ファージに用いた結果を示す。

#### 材料および実験方法

使用したRNA ファージはいずれも大腸菌菌株に特異的に吸着, 増殖する。MS2 ファージ<sup>5)</sup>

は外国で分離されたが, Q $\beta$  ファージ<sup>1),6)</sup> は京都大学ウイルス研究所で分離された。また GA ファージ,<sup>7)</sup> TW 28<sup>8)</sup> ファージは慶応大学医学部・分子生物学教室で分離された。ファージ増殖に用いた大腸菌 K12 A/ $\lambda$  株および RNA ファージはいずれも慶応大学・分子生物学教室の渡辺格氏, 平島昭和氏より分与された。

ファージ増殖に用いた培地としては, ペプトン-ブドウ糖培地を用いた。培地 1 l 中に NaCl 5 g, ポリペプトン 20 g, ブドウ糖 2 g, 酵母抽出物 2.5 g, カザアミノ酸 2.5 g を含み (pH 7.2), オートクレーブ後 1 M CaCl<sub>2</sub> 10 ml を加えて, 振とう培養を行った。培養容器は 3 l の三角フラスコに 1 l の培地を入れて用い, 大型振とう培養器によった。大腸菌が  $1 \times 10^8$  / ml まで増殖したとき, moi=10 でファージを感染させ増殖を行った。ファージ感染 3 時間後, 1/20 容量のクロロホルムを加え, 15 分間振

とうし、上清のみを遠心し菌体を除いて溶菌液を得た。この溶菌液(Lysate)の感染価(PFU: plaque forming unit)は **Table 3** に示すごとく  $1 \sim 3 \times 10^{12}/\text{ml}$  である。リゾチームの影響をみるための実験は 3ml の培地で行い、感染 3 時間後に 1 mg/ml のリゾチームを 0.03 ml 加えその後前述のごとく処理した (**Table 1**)。

**Table 2** のデキストラン硫酸の影響をみる実験では溶菌液 1 l に対し (A) NaCl 17.5 g, Polyethylene glycol 6000 (半井化学) 69 g, デキストラン硫酸 (Na 塩) (半井化学, MW 50 万) 2 g を加えた。<sup>3)</sup> また **Table 2** 以外の実験にはいずれもこの条件を用いた。(B) は NaCl 35 g, Polyethylene glycol 6000 を 100g<sup>4)</sup> 加えた。溶菌液にポリエチレングリコールなどを加えてよく溶解させた後、4°C の冷房室に一夜静置した。静置後は上層 (upper phase) を約 80% 取り除き、**Table 2** の実験ではこの上層と下層 (lower phase) の感染価を測定した。さらにファージの精製を行うためには、この下層を 8,000 回転/分、20 分間遠心して沈殿を集め、STE 緩衝液 (0.1M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) に溶解した。デキストラン硫酸を除くために等容の 2M KCl を徐々に加えて、20 分後に遠心分離して、上清を得た (KCl sup)。この上清 100 ml あたり 31 g の硫酸アンモニウムを加えて、2 時間水中に保存または一夜放置後、遠心分離によって沈殿を集めた。この沈殿を少量の STE 緩衝液に溶かして、透析によって硫酸アンモニウムを除いた (AmSO<sub>4</sub> dialysed)。このファージ液に塩化セシウムを加えて、屈折率を測定して  $N_D = 1.3773$  とし密度を 1.46 になるよう調整した。この塩化セシウムを加えたファージ液はチューブの上方に流動パラフィンを加えてバランスを取り、SW 41 ローターを用いて Beckman Ultracentrifuge L5-50 により 35,000 rpm 24 時間遠心した。ファージ層は肉眼で見ることができるので、ファージ層に注射針を注入してファージ層のみを分取した。分取したファージ層は ST 緩衝液 (0.14 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) に対して透析して、精製ファージを得た

(CsCl purified)。ファージの感染価の測定は標準的な重層法により E. Coli K12 A/λ を指示菌として用いて行った。なお精製ファージの濃度測定は Qβ ファージで得られた  $A_{260\text{nm}}^{0.1\%} = 7.8^{1)}$  を用いた。

沈降速度の分析は日立分析用超遠心機 (282) により行い、TW 28 ファージの結果を **Figure 1** に示した。測定条件は、0.14 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 試料濃度は 0.3% の溶液を用いての沈降係数  $S_{20}$  は 83.3 であった。分析結果はシュリーレン光学系で単一の対称なピークが得られたので、均一な高分子物質であることを示している (**Fig. 1**)。なお沈降測定は組織培養免疫センターの北 昭子さんにしていただいた。

## 実験結果

ファージの増殖による収率を上げるために菌体を壊す必要がある。そのためにはクロロホルム処理によるが、さらにリゾチーム処理を加えての影響をみたものが **Table 1** である。この結果が示すごとく、リゾチーム処理によって収率は上っていない。したがって後の実験にはクロロホルム処理のみを行った。**Table 2** には溶菌液からファージを濃縮するための方法を検討した結果を示した。大量培養のためにはより容

**Table 1.** Lysozyme effect on Qβ phage release

	Chloroform	Lysozyme-Chloroform
PFU/ml	$1.2 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12}$

**Table 2.** Sodium dextran sulfate effect on Qβ phage precipitation

(1.5 l)	PFU/ml	
	(A) PEG+NaD. sulfate	(B) PEG
upper phase (1.3 l)	$4.1 \times 10^{10}$	$1.3 \times 10^{11}$
lower phase (0.2 l)	$4.5 \times 10^{12}$	$5.9 \times 10^{11}$

PEG: Polyethylene glycol 6000

NaD. sulfate: Sodium dextran sulfate (MW 500,000)

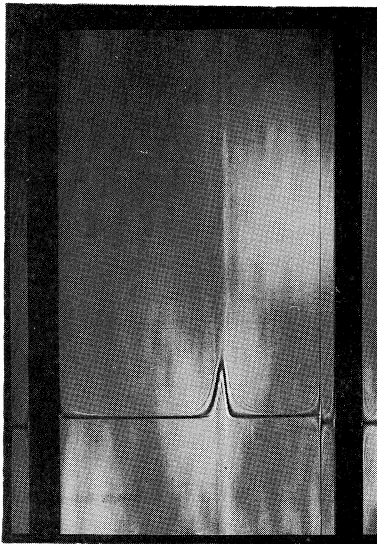
**Table 3.** Recovery of phage titer (PFU)

Phage group Phage	I MS 2	II GA	III Q $\beta$	IV TW 28
Lysate/ml	$2.7 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.7 \times 10^{12}$
*Lysate	$8.1 \times 10^{15}$	$4.5 \times 10^{15}$	$3.6 \times 10^{15}$	$5.1 \times 10^{15}$
KCl sup.	$1.3 \times 10^{16}$	$3.1 \times 10^{15}$	$1.8 \times 10^{15}$	$4.0 \times 10^{15}$
AmSO <sub>4</sub> dialysed	$2.4 \times 10^{14}$	$2.1 \times 10^{14}$	$2.7 \times 10^{14}$	$3.4 \times 10^{14}$
CsCl purified	$4.8 \times 10^{12}$	$3.6 \times 10^{13}$	$1.1 \times 10^{14}$	$2.0 \times 10^{14}$

\*PFU (plague forming unit) per 3 liter culture

**Table 4.** Specific activity of purified RNA phages from four different groups

Phage group	I	II	III	IV
Phage	MS 2	GA	Q $\beta$	TW 28
PFU/mg/ml	$7.1 \times 10^{13}$	$2.8 \times 10^{13}$	$1.0 \times 10^{13}$	$2.2 \times 10^{13}$



**Fig. 1.** Sedimentation pattern of purified TW 28 phage in 0.14 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5 at a concentration of 3.0 mg/ml

易に第一段階の溶菌液からの濃縮を行えることが重要である。この結果が示すように、ポリエチレングリコールにデキストラン硫酸を加えると、より効率的にフェージは下層に沈殿していることがわかる。上層はデカントにより除くことが可能である。

この結果から、デキストラン硫酸を加えた系を用いて、RNA フェージの四つのグループから各1種類ずつを用いてフェージの精製を行った。ポリエチレングリコール-デキストラン硫酸による沈殿後、KClを加えてデキストラン硫酸を除いて、さらに硫酸分画によりフェージを得て、最後に塩化セシウムによる密度勾配遠心による精製を行った。その結果は **Table 3** に示している。この表では3 lの培養液より始めた培養の結果を示した。精製フェージの収量は培養1 lあたり0.2~3 mgを示してかなり幅がある。

精製されたRNA フェージの結果を1 mg/mlあたりの感染価を示したのが、**Table 4** である。この表に示す結果ではPFU/mg/mlは $1.0 \sim 7.1 \times 10^{13}$ までの広がり示した。

**Figure 1**には精製フェージの一つであるTW 28の沈降パターンシュリーレン光学系による分析結果を示している。この結果は単一でしかも対称なパターンを示しており、この高分子物質であるフェージがほとんど分解のないことを示している。

### 考 察

大量にフェージを培養して精製するためには溶菌液からの第一段階の濃縮が容易であることが重要である。そのためには溶菌液を遠心分離にかけたり、硫酸分画するよりはポリエチレングリコールとデキストラン硫酸を加えて沈殿させ、デカンテーションによって上層を除く方法が有効であることがわかる。**Table 3**に示している結果は精製の過程での感染価の低下が著しい。この原因は明らかではないが、溶菌液を保存しておくだけでも、初めのうちには感染価の低下が著しいので、それらのことが寄与している可能性はある。

また **Table 4** に示すPFU/mg/mlの値からはフェージによって $1.0 \times 10^{13} \sim 7.1 \times 10^{13}$ までかなりの幅がある。これはフェージによって

安定性に差があるのか、初めの溶菌液の中の活性ファージに差があるのか明らかでない。しかし、(I) グループ MS 2 ファージの値は、同じグループの R 17 ファージについて報告されている値<sup>4)</sup>に近い値を示しており、さほど異なった値ではないようにみえる。また、(IV) グループの TW 28 ファージを分析用超遠心機にかけ

て分析した結果を **Figure 1** に示したが、このシュリーレンパターンが単一でしかも対称なピークを示していることから、精製の過程で分解したとは考えにくい。以上の結果からこの方法はファージの大量培養にとって都合がよい方法と考えられる。

## 文 献

- 1) 西原 徹, 渡辺 格: 大腸菌ファージ Q $\beta$  の精製とその性質. ウィルス 16: 1-6, 1966
- 2) Pace, N. R., Haruna, I. and Spiegelman, S.: The preparation of an RNA replicase capable of synthesizing biologically active viral RNA. *In Methods in enzymology*, eds. by Glossman, L. and Moldave, K. New York, Academic Press. 1968, 12 B pp. 540-555
- 3) Eoyang, L. and August, J. T.: Phage Q $\beta$  RNA polymerase. *In Methods in enzymology*, eds. by Glossman, L. and Moldave, K. New York, Academic Press. 1968, 12 B pp. 530-540
- 4) Yamamoto, K. R. and Alberts, B. M.: Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40: 734-744, 1970
- 5) Strauss, J. H. and Sinsheimer, R. L., Jr.: Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. *J. mol. Biol.* 7: 43-54, 1963
- 6) Overby, L. R., Barlow, G. H., Doi, R. H., Jacob, M. and Spiegelman, S.: Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I. Properties of the viral particles. *J. Bacteriol.* 91: 442-448, 1966
- 7) Watanabe, I., Nishihara, T., Kaneko, H., Sakurai, T. and Osawa, S.: Group characteristics of RNA phages. *Proc. Japan Acad.* 43: 210-213, 1967
- 8) 三宅 端, 古瀬浩介, 柴 忠義, 碧井 猛, 桜井稔三, 渡辺 格: 台湾における RNA ファージの探索とその分布状態の調査. 慶応医 48: 25-34, 1971